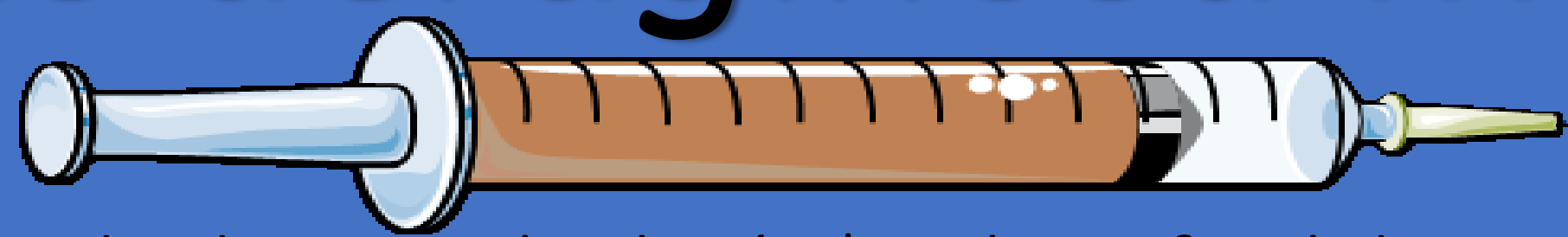


Búsqueda y generación de cepas vacunales de *Pseudomonas aeruginosa* mediante CRISPR-Cas9



Ángela Martínez Mateos | Grado de Microbiología | Trabajo final de grado-Propuesta de proyecto de investigación

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

ANTECEDENTES

Pseudomonas aeruginosa es un organismo gramnegativo ubicuo. Presenta una gran adaptabilidad y acumula una gran cantidad de resistencias a antibióticos. Es uno de los patógenos que genera más infecciones respiratorias. Una aproximación para su prevención son las **vacunas**, pero hasta el momento ninguna ha sido aprobada para salud humana.

El descubrimiento del **sistema CRISPR-Cas** ha proporcionado una herramienta biotecnológica en el desarrollo de vacunas. Uno de los más utilizados es **CRISPR-cas9** que presenta dos RNAs: **crRNA** y **tracrRNA** (en muchos casos, un **sgRNA** quimérico) y la proteína **Cas9** (Figura 1).

La **propuesta** consiste en el desarrollo de candidatos vacunales de *Pseudomonas aeruginosa* mediante CRISPR-Cas9.

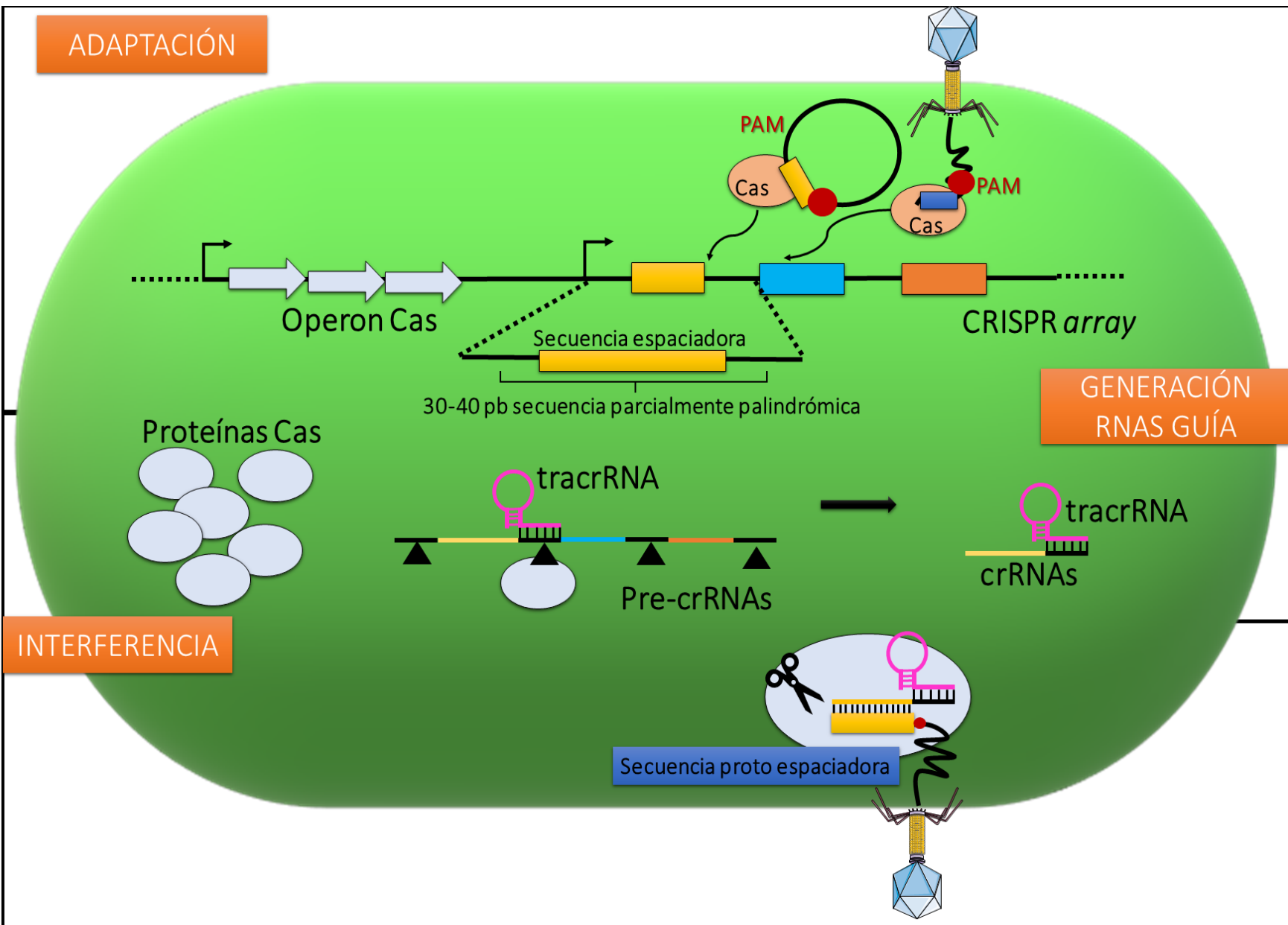


Figura 1. Sistema CRISPR-Cas9. Adaptación, incorporación DNA invasor por reconocimiento de PAM (protospacer adjacent motif), generación RNAs guía e interferencia del invasor junto con el tracrRNA (trans-activating crRNA)

METODOLOGÍA

1) Selección de mutantes de interés

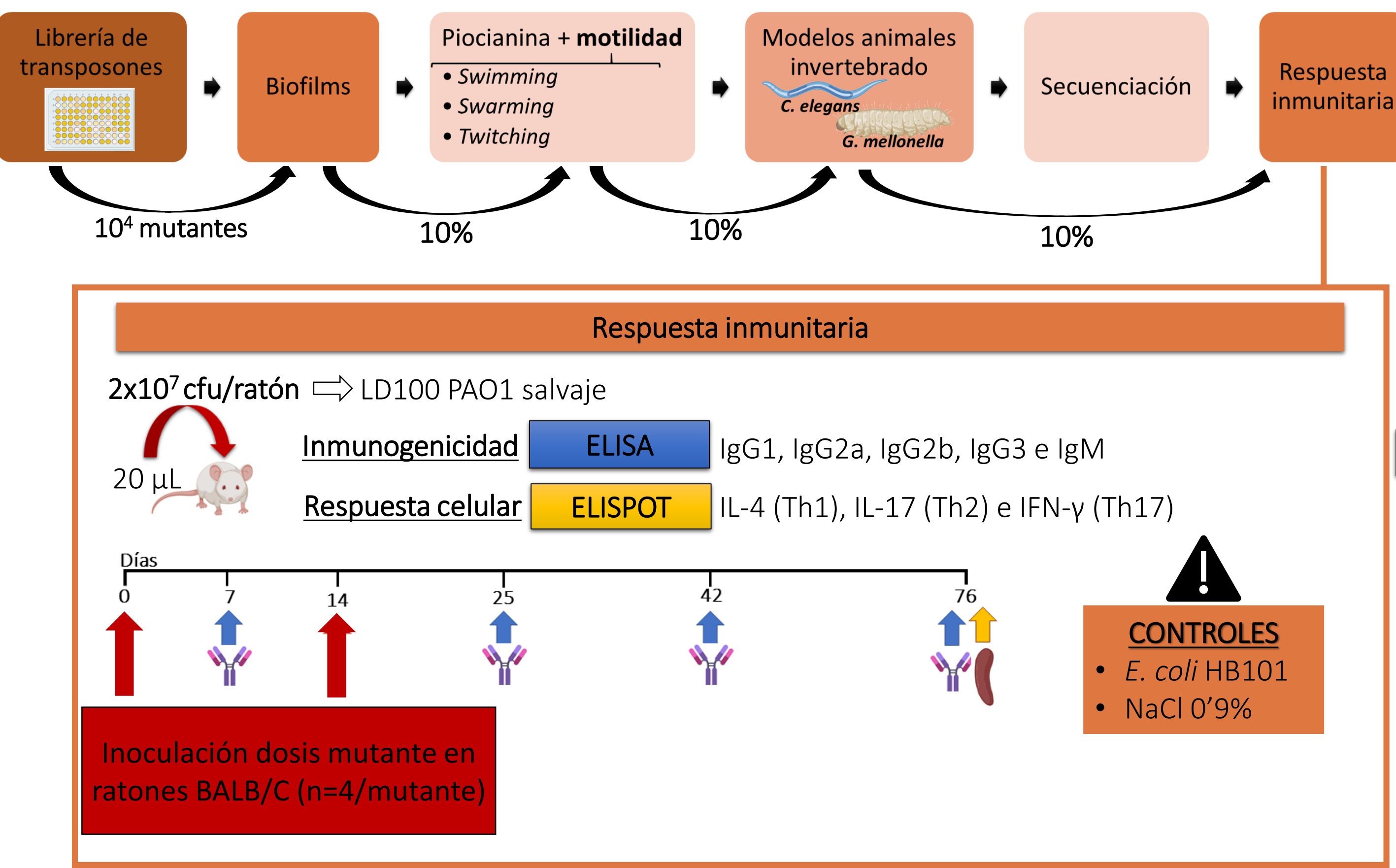


Figura 2. Pasos de selección de mutantes y valoración de la respuesta inmunitaria. Se seleccionan 10⁴ mutantes (80% probabilidad de gen interrumpido) hasta conseguir ~10 mutantes con los que se analizará la respuesta inmunitaria, inmunogenicidad y respuesta celular, en ratones BALB/c pathogen free.

3) Challenge y protección en ratones BALB/c

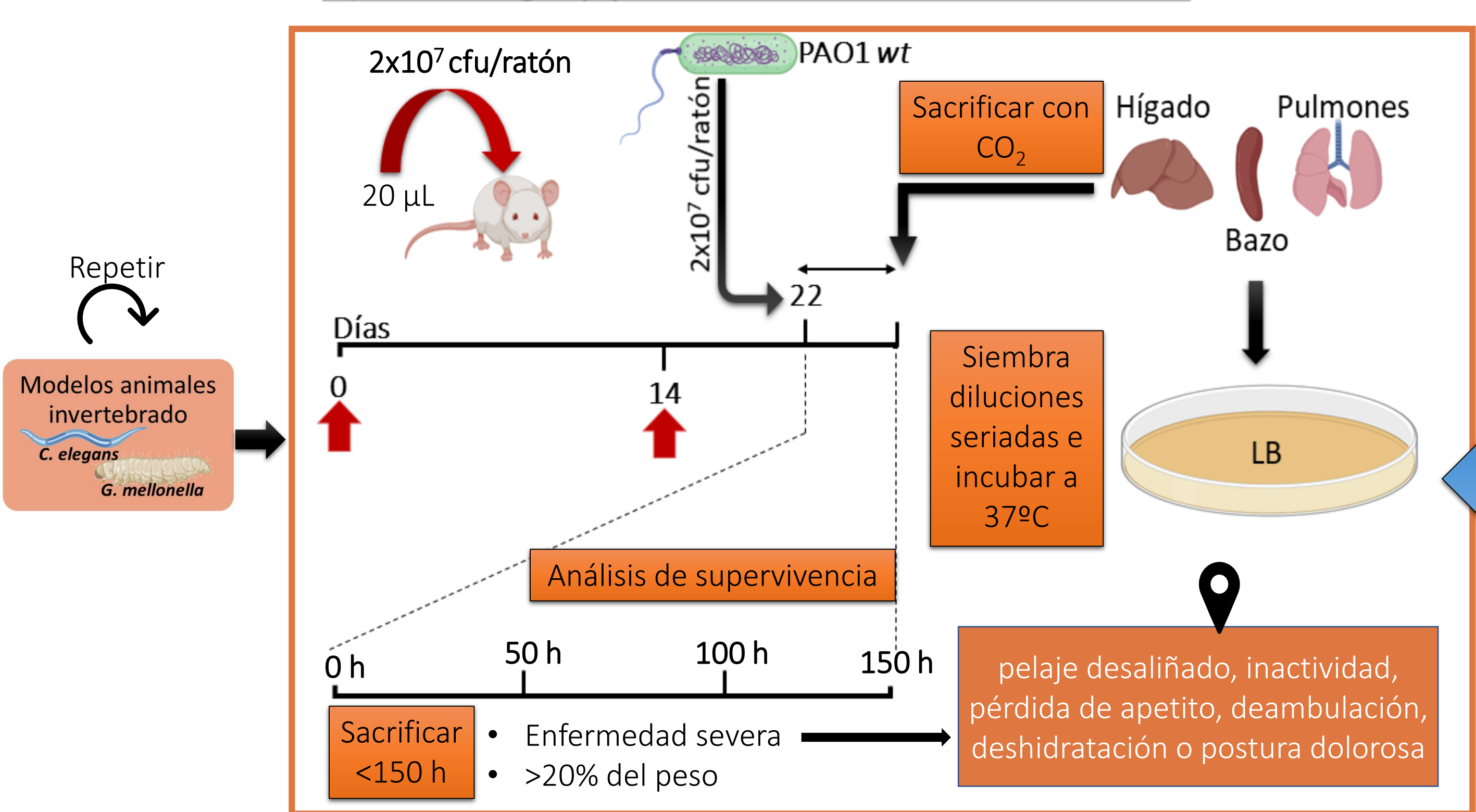


Figura 5. Challenge y análisis de protección. Inicialmente, se comprueba la disminución de virulencia en invertebrados. Seguidamente, día 22, se lleva a cabo el challenge en ratones BALB/c inmunizados. Se analiza la mortalidad de los ratones BALB/c (n=10/mutante) hasta las 150 h. Mueren o se sacrifican y se analiza la carga bacteriana en bazo, hígado y pulmón.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El **objetivo principal**: generación de mutantes que puedan ser utilizados como cepas vacunales y que sean capaces de generar inmunogenicidad y protección *in vivo*. Y **objetivos específicos**:

- Selección y cribaje de mutantes de interés.
- Generación de mutantes mediante CRISPR-Cas9.
- Valoración de la inmunogenicidad y protección *in vivo*.

La **hipótesis** es que la utilización de la herramienta CRISPR-Cas9 en el desarrollo de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* podría permitir la obtención eficiente de candidatos vacunales.

2) Edición génica mediante CRISPR-Cas9

1. Construcción y presentación de los plásmidos pACRISPR_sgRNA con los brazos de reparación y pCaSPA

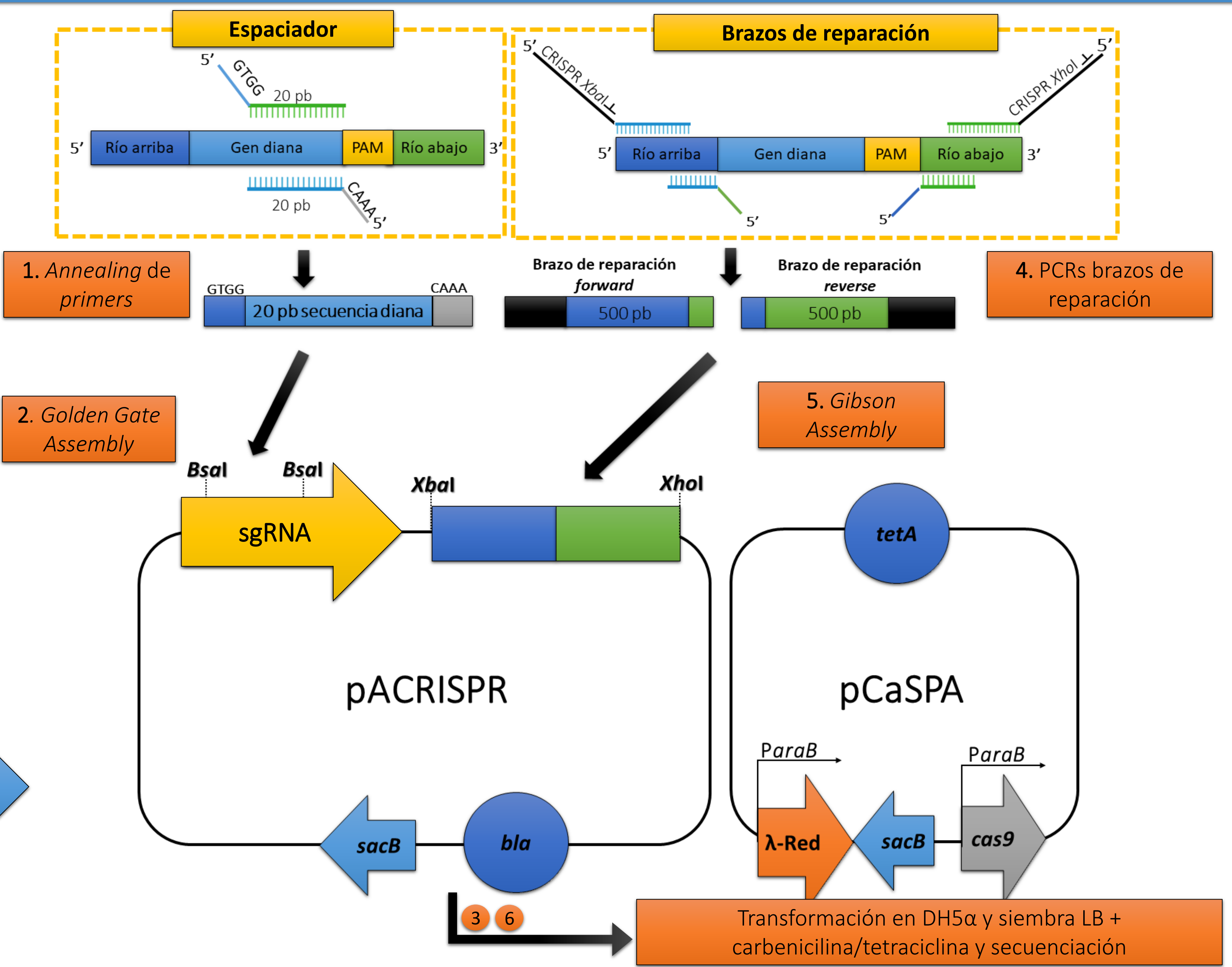


Figura 3. Construcción del plásmido pACRISPR y presentación del plásmido pCaSPA. En la construcción del plásmido pACRISPR se produce clonación del espaciador (20 pb río arriba de la secuencia PAM del gen diana) y los brazos de reparación (500 pb río arriba y río abajo del gen diana) en este y transformación en DH5α.

2. Procedimiento de edición génica, selección de mutantes y curación plasmídica

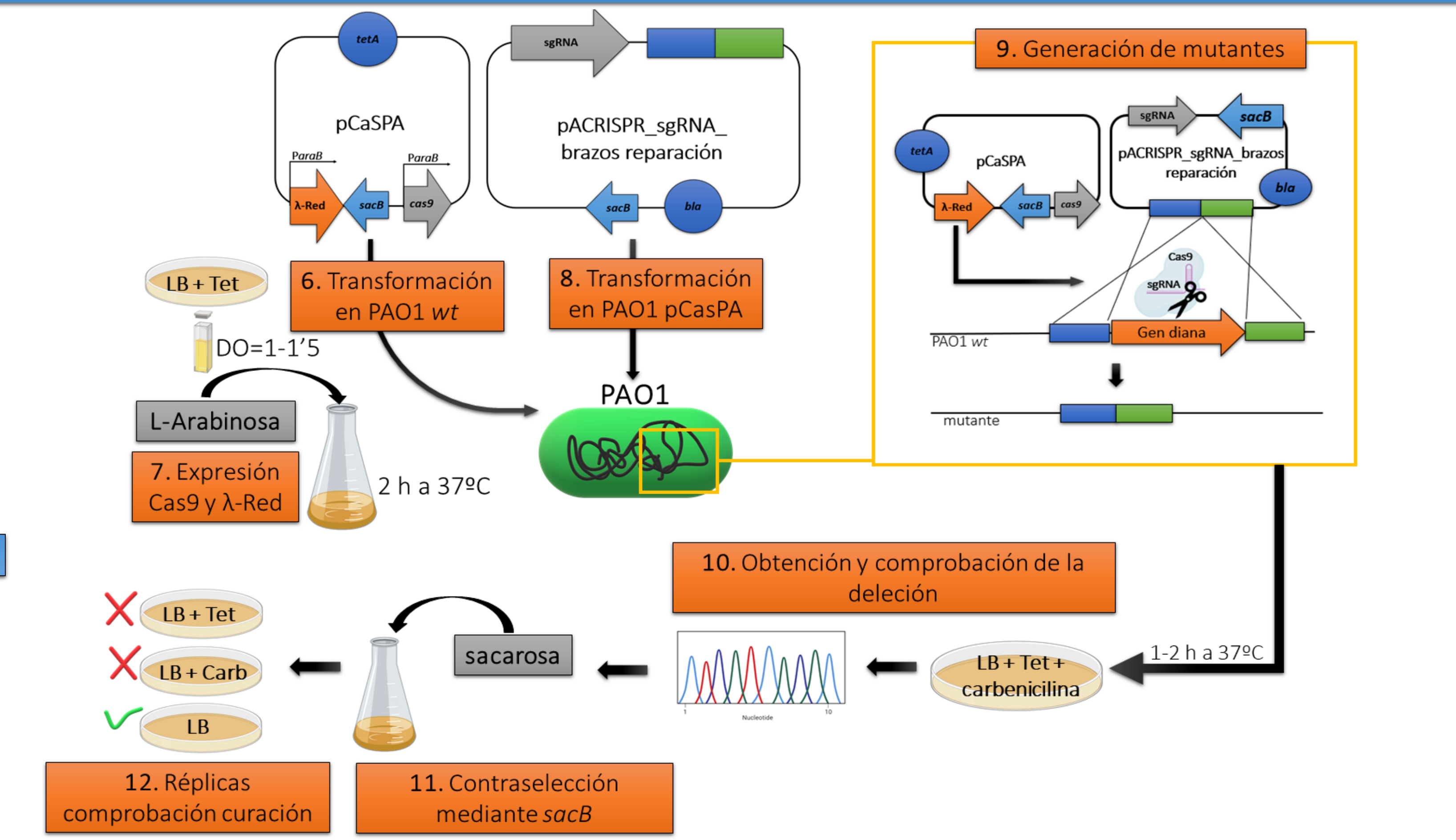


Figura 4. Procedimiento de edición génica mediante CRISPR-Cas9 y el sistema λ-Red, y curación plasmídica. En resiembras de PAO1 pCasPA se inducen Cas9 y λ-Red, y se generan competentes. Se transforma el plásmido pACRISPR_sgRNA_brazos de reparación y se lleva a cabo la delección. Se comprueba por secuenciación. Se curan los plásmidos y se comprueban por réplicas.

RESULTADOS ESPERADOS

- ↓ biofilms, motilidad y pociocina → Virulencia? → Modelos animales de invertebrado → Respuesta inmunitaria? → Modelos ratón BALB/c
 - Mutantes de interés mediante CRISPR-Cas9
 - Protección (=supervivencia) durante un challenge con PAO1 y ↓ carga bacteriana
- Inmunogenicidad: duradera y eficaz
 - Respuesta celular

PLAN DE DIFUSIÓN

Prioridad 1 lista de bacterias resistentes a antibióticos

- Publicación en revistas ámbito: Microbiología, Vacunología, Enfermedades infecciosas y Biología molecular.
- Congresos y difusión en: Asociación Española de Vacunología y el Forum of International Respiratory Societies.
- Potenciación de la línea de investigación: Vacunas multivalentes

REFERENCIAS

[1] Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013;67(3):159–73. doi: 10.1111/2049-632X.12033; [2] Sharma A, Krause A, Worgall S. Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. Hum Vaccin. 2011;7(10):999–1011. doi: 10.4161/hv.7.10.16369; [3] Chen W, Zhang Y, Zhang Y, Pi Y, Gu T, Song L, et al. CRISPR/Cas9-based Genome Editing in *Pseudomonas aeruginosa* and Cytidine Deaminase-Mediated Base Editing in *Pseudomonas* Species. iScience. 2018;6:222–31. doi: 10.1016/j.isci.2018.07.024; [4] Dubern JF, Cigana C, De Simone M, Lazenby J, Juhas M, Schwager S, et al. Integrated whole-genome screening for *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes using multiple disease models reveals that pathogenicity is host specific. Environ Microbiol. 2015;17(11):4379–93. doi: 10.1111/1462-2920.12863; [5] Cabral MP, García P, Beceiro A, Rumbó C, Pérez A, Moscoso M, et al. Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy. Nat Commun. 2017;8(May). doi: 10.1038/ncomms15480